

**Dialog eLink Order File History**

1/5/1

DIALOG(R)File 351: Derwent WPI

(c) 2010 Thomson Reuters. All rights reserved.

0009898885 Drawing available

WPI Acc no: 2000-197540/200018

XRAM Acc no: C2000-061363

**Use of glucuronan oligo- or polysaccharides, especially produced by Rhizobium meliloti, as cytokine production stimulants for preparing immunostimulant agents**

Patent Assignee: UNIV PICARDIE VERNE JULES (UYPI-N)

Inventor: COURTOIS B; COURTOIS S J

**Patent Family ( 1 patents, 1 countries )**

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
FR 2781673	A1	20000204	FR 19989647	A	19980728	200018	B

Priority Applications (no., kind, date): FR 19989647 A 19980728

**Patent Details**

Patent Number	Kind	Lan	Pgs	Draw	Filing Notes
FR 2781673	A1	FR	17	0	

**Alerting Abstract FR A1****NOVELTY** - A glucuronan oligosaccharide or polysaccharide (I) with a molecular weight of 5-700 kD is used as a cytokine production stimulant for preparing an immunostimulant agent.**DESCRIPTION** - A glucuronan oligosaccharide (Mw: 5000-100000) or polysaccharide (Mw: 100000-700000) (I) selected from beta(1-4) D-polyglucuronic acids of formula (Ia) and their esters and ethers, is used as a cytokine production stimulant for preparing an immunostimulant agent.

An INDEPENDENT CLAIM is also included for the production of a beta(1-4) D-polyglucuronic acid oligosaccharide with a molecular weight of 5-60 kD, comprising:

1. culturing *Rhizobium meliloti* (NCIMB 40472) (synonym *Sinorhizobium meliloti*) to produce an extracellular beta(1-4) D-polyglucuronic acid polysaccharide with a molecular weight of 100-700 kD;
2. subjecting the polysaccharide to enzymatic hydrolysis in the culture medium using NCIMB 40472 as a source of glucuronan lyase; and
3. isolating the resulting oligosaccharide.

**ACTIVITY** - Immunostimulant; antiinflammatory.**MECHANISM OF ACTION** - Cytokine production stimulant. Partially acetylated *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides with molecular weights of 200 and 350 kD were more effective in stimulating interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha production by human blood monocytes than lipopolysaccharide or alginate (no data given).**USE** - (I) stimulates production of cytokines, e.g. interleukin-6, interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha, in eukaryotic cells and is useful for preparing immunostimulant medicaments for treating immunodeficiency disorders, especially inflammation, and is also useful for stimulating recombinant cytokine production by transformed bacteria.**Title Terms /Index Terms/Additional Words:** OLIGO; PRODUCE; RHIZOBIUM; CYTOKINE; STIMULATING; PREPARATION; IMMUNOSTIMULANT; AGENT

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
 INSTITUT NATIONAL  
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
 PARIS

(11) N° de publication :  
 (à n'utiliser que pour les  
 commandes de reproduction)

**2 781 673**

(21) N° d'enregistrement national :

**98 09647**

(51) Int Cl<sup>7</sup> : A 61 K 31/715, A 61 K 31/19, A 61 P 29/00

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1**

(22) Date de dépôt : 28.07.98.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : UNIVERSITE DE PICARDIE JULES  
 VERNE Etablissement public à caractère scientifique et  
 culturel — FR.

(43) Date de mise à la disposition du public de la  
 demande : 04.02.00 Bulletin 00/05.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
 recherche préliminaire : Se reporter à la fin du  
 présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux  
 apparentés :

(72) Inventeur(s) : COURTOIS SAMBOURG JOSIANE et  
 COURTOIS BERNARD.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : CABINET FEDIT LORIOT.

(54) UTILISATION D'UN GLUCURONANE EN TANT QU'AGENT IMMUNOSTIMULANT, PROCEDE DE  
 PREPARATION.

(57) La présente invention concerne l'utilisation de glucuronanes à enchaînement  $\beta$  (1-4) et ayant un poids moléculaire moyen en poids compris entre 5000 et 700000 Da, en tant qu'agents immunostimulants. Elle concerne également le procédé de préparation de glucuronanes à enchaînement  $\beta$  (1-4) et ayant un poids moléculaire moyen en poids compris entre 5000 et 60000 Da.

FR 2 781 673 - A1



2781673

1

## Utilisation d'un glucuronane en tant qu'agent immunostimulant, procédé de préparation

5

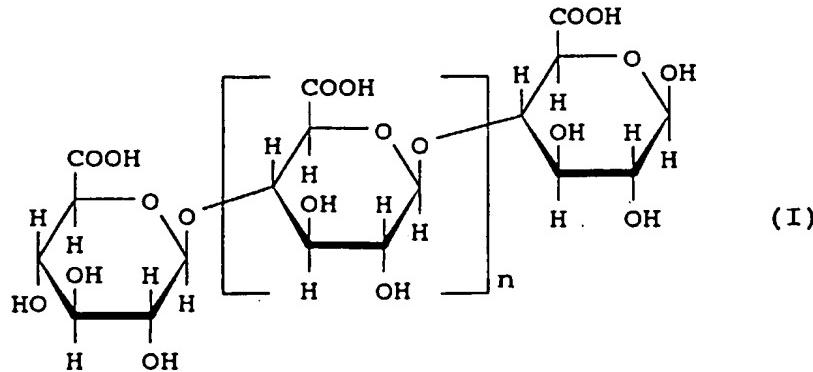
### *Domaine de l'invention*

La présente invention concerne une nouvelle utilisation, en tant qu'agent immunostimulant, d'un produit connu, à savoir un glucuronane à enchaînement  $\beta(1-4)$  selon la publication WO-A-93/18174. Elle concerne également un nouveau procédé de préparation d'un glucuronane à enchaînement  $\beta(1-4)$  selon ladite publication ayant un poids moléculaire moyen en poids (Mw) de 5000 à 60000 Da.

### *Art antérieur*

Dans la publication WO-A-93/18174 précitée, on a décrit en tant que produits industriels des dérivés polymères de l'acide D-glucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  qui sont utiles notamment en tant qu'agents gélifiants, épaississants, hydratants, stabilisants, chélatants et/ou floculants d'une part, et qui sont particulièrement intéressants en cosmétique, d'autre part, ces dérivés polymères étant choisis parmi

20 (a) les acides D-polyglucuroniques à enchaînement  $\beta(1-4)$  de formule



25 dans laquelle n est un nombre tel que le poids moléculaire moyen en poids (Mw) soit compris entre environ 5000 et environ 700000 Da,

2781673

2

- (b) les esters correspondants,
- (c) les éthers correspondants, et
- (d) leurs mélanges.

Selon le procédé de ladite publication WO-A-93/18174 précitée, on prépare un polysaccharide (PS) du type glucuronane de formule I partiellement acétylé suivant une technique comprenant :

- (i) la fermentation d'une souche de *Rhizobium meliloti* (autre nomenclature : *Sinorhizobium meliloti*) NCIMB 40472 sur un milieu nutritif,
- 10 (ii) la filtration du milieu de fermentation pour écarter les cellules de ladite souche et recueillir le filtrat,
- (iii) l'isolation d'un glucuronane de poids moléculaire moyen en poids élevé (PS ;  $700000 \geq Mw \geq 100000$ ) par précipitation dudit filtrat au moyen (a) d'un alcool (notamment EtOH ou iPrOH) ou d'une cétone (notamment MeCOMe) ou (b) en milieu acide aqueux (pH 3), puis
- 15 (iv) le cas échéant, l'hydrolyse en milieu acide ou par voie enzymatique dudit PS pour obtenir un oligosaccharide (OS ;  $100000 > Mw \geq 5000$ ).

De l'article de G. de RUITER et al., *Carbohydrate Polymers*, 20 1992, 18, pages 1-7, on sait que des OS du type acide D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et ayant un Mw compris entre 5500 et 10000 ont été obtenus à partir de moisissures appartenant à l'ordre des mucorales.

On sait que les liposaccharides (LPS) peuvent stimuler dans les monocytes la production de cytokines. D'une manière générale, les PS et OS différents des LPS n'agissent pas en tant qu'agents immunostimulants.

Cependant, de façon ponctuelle, on sait de l'article de M. OTTERLEI et al., *J. Immunother.*, 1991, 10 (No. 4), pages 286-291 que des alginates stimulent la production de TNF- $\alpha$  (facteur  $\alpha$  de nécrose tumorale), Il-1 (interleukine-1) et Il-6 (interleukine-6) par les monocytes, 30 que des D-polyglucoses à enchaînement  $\beta(1-3)$  et aminés stimulent la production de Il-1 par les macrophages humains, et que des arabino-galactanes stimulent la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les macrophages. Parmi les alginates, qui sont des PS ou OS constitués de séquences homopolymères d'acide mannuronique (M), de séquences homopolymères 35 d'acide guluronique (G) et de séquences alternées d'acide mannuronique et

2781673

3

d'acide guluronique (MG), ledit article de M. OTTERLEI et al. enseigne que ceux ayant une teneur élevée en acide mannuronique sont les plus actifs en ce qui concerne la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6 par les monocytes.

5      *But de l'invention*

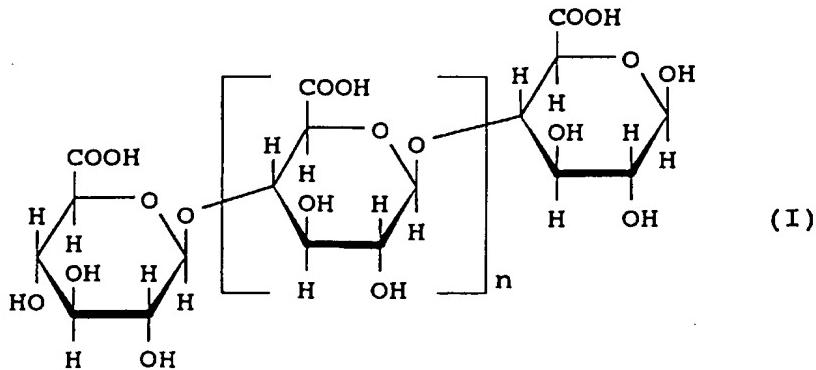
On se propose de fournir, selon un premier aspect de l'invention, une nouvelle solution technique, non décrite ni suggérée par l'art antérieur, pour résoudre le problème de la stimulation de la production de cytokines par les cellules.

10     Selon un second aspect de l'invention, on se propose de fournir un nouveau procédé de préparation d'un OS du type D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et ayant un Mw de 5000 à 60000 Da, qui donne des rendements supérieurs à ceux de l'hydrolyse selon ladite publication WO-A-93/18174 précitée.

15     *Objet de l'invention*

Selon la nouvelle solution technique de l'invention, l'on recommande une nouvelle utilisation d'un produit polysaccharidique, caractérisée en ce que l'on fait appel à un glucuronane choisi parmi

20     (a) les acides D-polyglucuroniques à enchaînement  $\beta(1-4)$  de formule



25     dans laquelle n est un nombre tel que le poids moléculaire moyen en poids (Mw) soit compris entre environ 5000 et environ 700000 Da,

(b) les esters correspondants,

(c) les éthers correspondants, et  
(d) leurs mélanges,  
en tant que substance stimulant la production d'une cytokine, et destiné à la préparation d'un agent biologiquement ou thérapeutiquement immuno-stimulant, ledit glucuronane étant un oligosaccharide (OS ;  $100000 > Mw \geq 5000$ ) ou un polysaccharide (PS ;  $700000 \geq Mw \geq 100000$ ).

5 Selon l'invention l'on recommande également un procédé de préparation d'un OS du type D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et ayant un Mw de 5000 à 60000 Da, ledit procédé, qui comprend :

10 (1°) la fermentation d'une souche de *Rhizobium meliloti* (autre nomenclature : *Sinorhizobium meliloti*) NCIMB 40472 produisant exocellulairement un glucuronane qui est un PS du type D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et ayant un Mw tel que  $700000 \geq Mw \geq 100000$ ,

15 (2°) l'hydrolyse enzymatique dudit PS pour obtenir un glucuronane qui est un OS du type D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et ayant un Mw de 5000 à 60000 Da, et

(3°) l'isolation dudit OS,

étant caractérisé en ce que l'hydrolyse enzymatique de l'étape (2°) est 20 effectuée dans le milieu de fermentation de l'étape (1°) en présence des bactéries de la souche NCIMB 40472 intervenant en tant que source de glucuronane lyase.

#### Abréviations

Par commodité, les abréviations et acronymes suivants ont été 25 utilisés dans le texte de la présente invention.

Ac	acétyle
ANA	alginate de <i>A. nodosum</i> contenant 46 % en poids d'unité acide $\alpha$ -L-guluronique (produit testé dans M. OTTERLEI et al.)
Bu	n-butyle
dp	degré de polymérisation
Et	éthyle
EtO	éthyoxy
GL-1	glucuronane de formule I selon l'invention, où les fonctions alcool OH sont partiellement O-acétylées et qui a un Mw de 35 200000 Da

2781673

5

	GL-2	glucuronane de formule I selon l'invention, où les fonctions alcool OH sont partiellement O-acétylées et qui a un Mw de 350000 Da
	iBu	isobutyle
5	iBuO	isobutyloxy
	iPr	isopropyle
	iPrO	isopropyloxy
	LPS	lipopolysaccharide
	M2	milieu nutritif aqueux de production, préféré selon l'invention, contenant 1 g/l d'extrait de levure, 1 g/l de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2 g/l de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O et 10 g/l de glucose, fructose ou saccharose
10	Me	méthyle
	MeO	méthyloxy
	Mw	poids moléculaire moyen en poids
15	NCIMB	National Collection of Industrial and Marine Bacteria, (il s'agit d'un organisme britannique agréé pour le dépôt de souches)
	OS	oligosaccharide
	Pr	n-propyle
	PS	polysaccharide
20	RT	température ambiante (15-25°C)
	sBu	s.-butyle
	sBuO	s.-butyloxy
	tBu	t.-butyle
	tBuO	t.-butyloxy
25	<i>Description détaillée de l'invention</i>	
	Les glucuronanes selon l'invention comprennent donc les acides polyglucuroniques de formule I, leurs esters, leurs éthers et leurs mélanges.	
	Plus précisément, ledit glucuronane est choisi parmi l'ensemble constitué par	
30	- les acides polyglucuroniques de formule I,	
	- les esters des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels le reste OH d'au moins un groupe acide carboxylique COOH est remplacé par un reste alkoxy en C <sub>1</sub> -C <sub>4</sub> ,	
35	- les esters des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels	

2781673

6

l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste acyle aliphatic en C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>,

- les esters des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels (i) le reste OH d'au moins un groupe acide carboxylique COOH est remplacé par un reste alkoxy en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, et (ii) l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste acyle aliphatic en C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>,
- les éthers des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>,
- 10 - les éther-esters des acides polyglucuroniques de formule I dans lesquels (i) le reste OH d'au moins un groupe acide carboxylique COOH est remplacé par un reste alkoxy en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, et (ii) l'atome d'hydrogène d'au moins un groupe alcool OH est remplacé par un reste alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, et
- 15 - leur mélanges.

Les groupes alkoxy précités en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> peuvent être à chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, ils comprennent les groupes MeO, EtO, PrO, iPrO, BuO, iBuO, sBuO et tBuO.

Les groupes alkyle précités en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> peuvent être à chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, ils comprennent les groupes Me, Et, Pr, iPr, Bu, iBu, sBu et tBu.

Les groupes acyle aliphatic en C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> peuvent être à chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, ils comprennent les groupes Ac, COEt, COPr, COiPr.

25 Le glucuronane préféré selon l'invention a un Mw de 100000 à 500000 Da (et mieux 200000 à 350000 Da) et est choisi parmi l'ensemble constitué par

- les acides polyglucuroniques de formule I, et
- leurs esters dans lesquels les fonctions alcool OH sont partiellement 30 O-acétylées, chaque cycle acide glucuronique de la formule I comportant statistiquement jusqu'à 33 % en poids de groupes O-CO-CH<sub>3</sub> (i.e. OAc) par rapport au poids du cycle unitaire acide glucuronique.

Dans ce dernier cas, la fonction acétyloxy est localisée soit en position 2, soit en position 3, soit encore en positions 2 et 3 du cycle acide glucuronique.

2781673

7

Bien entendu, il est possible d'éliminer ladite fonction acétyloxy. La désacétylation est réalisée (comme indiqué dans WO-A-93/18174 précité) à un pH supérieur à 8,0 à RT (le pH supérieur à 8,0 étant obtenu au moyen d'une base forte notamment un hydroxyde de métal alcalin comme NaOH ou KOH). Ainsi, 7-8 heures à RT et à pH 11 suffisent pour désacétyler le composé polymère comportant jusqu'à 33 % en poids de groupe OAc par rapport au poids du cycle acide glucuronique.

La souche qui convient pour la préparation exocellulaire des OS et PS utiles comme agents immunostimulants est la souche *Rhizobium meliloti* NCIMB 40472 visée dans WO-A-93/18174.

Les glucuronanes utiles selon l'invention interviennent en tant qu'agents immunostimulants.

Selon une première variante ils sont, d'un point de vue biologique, destinés à la préparation d'au moins une cytokine par une cellule productrice. La cellule productrice peut être une bactérie comportant un plasmide qui a été modifié pour comporter un vecteur d'expression codant pour une cytokine protéïnique telle que TNF- $\alpha$ , IL-1 ou IL-6 ; dans ce cas l'amélioration du rendement de la production d'une telle cytokine par un glucuronane selon l'invention est faible. En revanche, quand la cellule productrice est une cellule eucaryote connue pour générer des cytokines, les rendements de production avec les glucuronanes sont nettement améliorés.

Selon une seconde variante, les agents immunostimulants sont, d'un point de vue thérapeutique, particulièrement intéressants pour la production *in vivo* des cytokines que l'organisme ne fournit pas en quantité suffisante, d'une part, ou pour la production *in vitro* desdites cytokines devant être administrées aux patients, d'autre part. Les cellules productrices sont dans ce cas des cellules eucaryotes, notamment les monocytes, les macrophages, les cellules T, voire encore d'autres cellules souches. Ainsi, les glucuronanes selon l'invention sont utiles à la préparation de médicaments immunostimulants destinés à une utilisation en thérapeutique vis-à-vis des désordres liés à une insuffisance immunostimulatoire, notamment en cas d'inflammation.

Parmi les cytokines, dont on veut favoriser la production à partir des cellules eucaryotes productrices, on peut citer notamment

2781673

8

**TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6.**

Le procédé de préparation des OS selon l'invention comprend l'utilisation d'un ou plusieurs enzymes fournis par la souche NCIMB 40472 elle-même, le ou lesdits enzymes étant ou agissant en tant que glucuronane lyase. Ledit procédé comporte la conservation de ladite souche et la fragilisation de sa paroi pour profiter de la libération de ladite glucuronane lyase ou du produit enzymatique d'activité glucuronane lyasique lors de l'hydrolyse enzymatique.

En pratique l'hydrolyse enzymatique est effectuée par incubation à pH 7, pendant 40 à 60 h, de préférence pendant 48 h, et à une température de 25-35°C, de préférence à 30°C.

Selon un premier mode de réalisation, l'hydrolyse enzymatique comprend (i) l'acidification du milieu de fermentation jusqu'à pH 3, (ii) la neutralisation, au plus tard 0,30 h après l'acidification, du milieu résultant avec une base, de préférence un hydroxyde de métal alcalin tel que NaOH ou KOH à une concentration de 1M à 3M, puis (iii) l'incubation en régulant le pH à 7 par addition de ladite base à une concentration de 1M.

Selon un second mode de réalisation l'hydrolyse enzymatique comprend (i) l'addition de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  au milieu de fermentation, puis (ii) l'incubation en régulant le pH à 7 par addition d'une base, de préférence un hydroxyde de métal alcalin tel que NaOH ou KOH à une concentration de 1M.

Le matériau de départ est le milieu de fermentation obtenu selon la préparation II de ladite publication WO-A-93/18174 précitée. Le procédé de l'invention offre l'avantage d'éviter l'isolation du PS, d'une part, et de fournir de meilleurs rendements en OS, d'autre part.

L'isolation des OS obtenus selon le procédé de la présente invention est réalisée selon une méthode connue en soi, en particulier l'une de celles décrites dans ladite publication WO-A-93/18174 précitée.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention seront mieux compris à la lecture qui va suivre d'exemples de réalisation et de résultats d'essais d'immunostimulation. Bien entendu l'ensemble de ces éléments n'est nullement limitatif mais est donné à titre d'illustration.

***Exemple 1***

On part du milieu de fermentation obtenu à l'issue de la

préparation II de WO-A-93/18174 qui comprend les PS produits de façon exocellulaire, les bactéries de la souche NCIMB 40472 et le milieu nutritif M2.

On ajuste à pH 3 ledit milieu de fermentation au moyen d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ , de 0,1 à 1M) que l'on ajoute par fraction pendant une durée totale supérieure ou égale à 0,08 h (de préférence pendant une durée totale de 0,10 à 0,20 h). On neutralise, au plus tard 0,30 h après l'acidification, le milieu résultant jusqu'à pH 7,0 au moyen de KOH (1M à 3M). On incube ensuite pendant 48 h à 30°C en ajustant le pH à 7,0 par addition de KOH 1M. Les OS obtenus qui ont un Mw de 5000 à 50000 Da peuvent être isolés comme indiqué dans ladite publication WO-A-93/18174 précitée.

*Exemple 2*

On part du milieu de fermentation obtenu à l'issue de la préparation II de WO-A-93/18174 qui comprend les PS produits de façon exocellulaire, les bactéries de la souche NCIMB 40472 et le milieu nutritif M2.

On ajoute audit milieu de fermentation  $Na_2SO_4$  (5 à 25 g/l). On incube ensuite pendant 48 h à 30°C en ajustant le pH à 7,0 par addition de KOH 1M. Les OS obtenus qui ont un Mw de 5000 à 50000 Da peuvent être isolés comme indiqué dans ladite publication WO-A-93/18174 précitée.

*Exemple 3*

L'isolation des OS des exemples 1 et 2 ci-dessus est réalisée comme suit. Les bactéries de la souche NCIMB 40472 sont éliminées du milieu les contenant par filtration ou centrifugation selon les modalités opératoires décrites dans la préparation V de WO-A-93/18174. Les molécules de OS ayant un Mw compris entre 20000 et 50000 Da, d'une part, et les molécules de OS ayant un Mw compris entre 5000 et 20000 Da, d'autre part, sont purifiées et isolées par ultrafiltration sur membrane à seuil de coupure sélectif selon les modalités données dans la préparation IX de WO-A-93/18174.

On obtient ainsi un rendement en masse d'environ 60 % pour les molécules de masse moyenne (Mw compris entre 20000 et 50000 Da) et d'environ 40 % pour les molécules de masse faible (Mw compris entre

5000 et 20000 Da). Une durée d'incubation prolongée (i.e. supérieure à 60 h) conduit à une augmentation du rendement en molécules de masse faible.

***Exemple 4 - Essais -***

5 Des essais de production de cytokines ont été mis en œuvre sur gel selon les modalités opératoires décrites dans l'article de M. OTTERLEI et al. précité, les cellules productrices étant des monocytes de sang humain. La production de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6) à partir de monocytes a été testée en présence de glucuronane selon l'invention, à 10 savoir GL-1 (Mw de 200000 Da) et GL-2 (Mw de 350000 Da). Les résultats obtenus, comparés à la production des mêmes cytokines à partir de monocytes en présence d'alginate (ANA) ou de LPS connus pour avoir un effet sur la production desdites cytokines, mettent en évidence que :

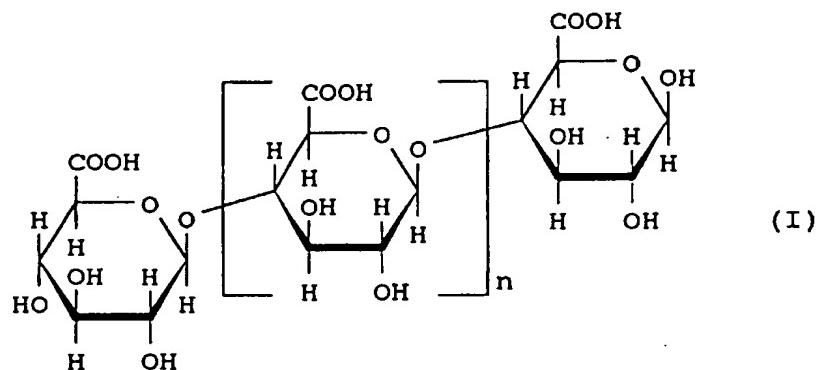
- 15 • GL-1 et GL-2 ont une activité supérieure à LPS et ANA, dans la production de IL-6 et TNF- $\alpha$ , et
- GL-1 et GL-2 ont une activité comparable à ANA, dans la production de IL-1.

2781673

11

***REVENDICATIONS***

- 5 1. Utilisation d'un produit polysaccharidique, caractérisée en ce que l'on fait appel à un glucuronane choisi parmi  
 (a) les acides D-polyglucuroniques à enchaînement  $\beta(1-4)$  de formule



10

dans laquelle n est un nombre tel que le poids moléculaire moyen en poids (Mw) soit compris entre environ 5000 et environ 700000 Da,

- 15 (b) les esters correspondants,  
 (c) les éthers correspondants, et  
 (d) leurs mélanges,

en tant que substance stimulant la production d'une cytokine, et destiné à la préparation d'un agent biologiquement ou thérapeutiquement immuno-stimulant, ledit glucuronane étant un oligosaccharide (OS ;  $100000 > Mw \geq 5000$ ) ou un polysaccharide (PS ;  $700000 \geq Mw \geq 100000$ ).

20 2. Utilisation suivant la revendication 1, caractérisée en ce que ledit glucuronane est destiné à la préparation d'au moins une cytokine par une cellule eucaryote.

25 3. Utilisation suivant la revendication 1, caractérisée en ce que ledit glucuronane est destiné à la préparation d'un médicament immunostimulant.

2781673

12

4. Utilisation suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit glucuronane est un PS ayant un Mw compris entre 100000 et 500000 Da et mieux entre 200000 et 350000 Da.
5. Utilisation suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit glucuronane est un acide D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  selon la formule I où les groupes de la fonction alcool OH sont partiellement acétylés.
- 10 6. Utilisation suivant la revendication 5, caractérisée en ce que, dans ledit glucuronane de formule I, les atomes d'hydrogène des fonctions alcool OH sont partiellement remplacés par des groupes acétyle, ledit glucuronane comportant statistiquement jusqu'à 33 % en poids de groupe OAc par rapport au poids du cycle unitaire acide glucuronique.
- 15 7. Procédé de préparation d'un OS du type D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et ayant un Mw de 5000 à 60000 Da, ledit procédé, qui comprend :
  - (1°) la fermentation d'une souche de *Rhizobium meliloti* (autre nomenclature : *Sinorhizobium meliloti*) NCIMB 40472 produisant exocellulairement un glucuronane qui est un PS du type D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et ayant un Mw tel que  $700000 \geq Mw \geq 100000$ ,
  - 20 (2°) l'hydrolyse enzymatique dudit PS pour obtenir un glucuronane qui est un OS du type D-polyglucuronique à enchaînement  $\beta(1-4)$  et ayant un Mw de 5000 à 60000 Da, et
  - (3°) l'isolation dudit OS,
- 25 8. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce que l'hydrolyse enzymatique est effectuée dans le milieu de fermentation de l'étape (1°) en présence des bactéries de la souche NCIMB 40472 intervenant en tant que source de glucuronane lyase.
- 30 9. Procédé suivant la revendication 8, caractérisée en ce que l'hydrolyse enzymatique comprend (i) l'acidification du milieu de fermentation jusqu'à pH 3, (ii) la neutralisation, au plus tard 0,30 h après

2781673

13

l'acidification, du milieu résultant avec une base, de préférence un hydroxyde de métal alcalin tel que NaOH ou KOH à une concentration de 1M à 3M, puis (iii) l'incubation en régulant le pH à 7 par addition de ladite base à une concentration de 1M.

- 5 10. Procédé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que l'hydrolyse enzymatique comprend (i) l'addition de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  au milieu de fermentation, puis (ii) l'incubation en régulant le pH à 7 par addition d'une base, de préférence un hydroxyde de métal alcalin tel que NaOH ou KOH à une concentration de 1M.

2781673

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
nationalFA 562879  
FR 9809647

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée	
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	<p>ESPEVIK, TERJE (1) ET AL: "The involvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1993) VOL. 23, NO. 1, PP. 255-261. ISSN: 0014-2980., XP002098274</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* page 255, colonne 1, alinéa 1 - colonne 2, alinéa 2 *</li> <li>* page 256, colonne 1, alinéa 1; figure 1; tableau 1 *</li> <li>* page 257, colonne 1, alinéa 2 - page 258, colonne 1, alinéa 1 *</li> <li>* page 260, colonne 1, alinéa 2 *</li> </ul> <p>---</p>	1-4	
X	<p>MICHAUD, P. ET AL: "Physicochemical properties of extracellular (1.fwdarw. 4)-.beta.-D-glucuronan produced by the Rhizobium meliloti M5N1CS strain during fermentation: evidence of degradation by an exoenzyme activated by Mg<sup>2+</sup>" INT. J. BIOL. MACROMOL. (1994), 16(6), 301-5 CODEN: IJBMDR; ISSN: 0141-8130, XP002098275</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* page 301, colonne 1, alinéa 1 - page 302, colonne 1, alinéa 5 *</li> </ul> <p>---</p> <p>-/-</p>	7,8	<p><b>DOMAINES TECHNIQUES</b> <b>RECHERCHES (Int.Cl.6)</b></p> <p>A61K</p>
1	Date d'achèvement de la recherche 15 avril 1999	Examinateur A. Jakobs	
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. O : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

2781673

REPUBLIQUE FRANCAISE

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
nationalFA 562879  
FR 9809647établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	<p>MICHAUD P ET AL: "Identification of glucuronan lyase from a mutant strain of Rhizobium meliloti." INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, (1997 AUG) 21 (1-2) 3-9. JOURNAL CODE: AY6. ISSN: 0141-8130., XP002098276</p> <p>ENGLAND: United Kingdom</p> <p>* page 4, colonne 1, alinéa 2 - page 5, colonne 2, alinéa 2; figure 2 *</p> <p>* page 8, colonne 1, alinéa 2 - colonne 2, alinéa 2 *</p> <p>---</p>	7,8
X	<p>ROBLOT, CORINNE ET AL: "Effects of salts on production and on O-acetylation of glucuronan excrete by the Rhizobium meliloti M5N1CS strain" INT. J. BIOL. MACROMOL. (1995), 17(6), 365-8 CODEN: IJBMDR;ISSN: 0141-8130, XP002098277</p> <p>* page 365, colonne 2, alinéa 1 - page 366, colonne 2, alinéa 3 *</p> <p>---</p>	7,8,10
X	<p>BERNTZEN, GORIL ET AL: "The tumor necrosis factor-inducing potency of 11popolysaccharide and uronic acid polymers is increased when they are covalently linked to particles" CLIN. DIAGN. LAB. IMMUNOL. (1998), 5(3), 355-361 CODEN: CDIMEN;ISSN: 1071-412X, XP002098278</p> <p>* abrégé *</p> <p>* page 356, colonne 1, alinéa 2; figure 1; tableau 1 *</p> <p>* page 357, colonne 1, alinéa 3 - colonne 2, alinéa 1 *</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-4
1	<p>Date d'achèvement de la recherche</p> <p align="center">15 avril 1999</p>	Examinateur A. Jakobs
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinents en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou amière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

2781673

REPUBLIQUE FRANCAISE

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

N° d'enregistrement  
nationalFA 562879  
FR 9809647établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée	
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	BERTOCCHI C ET AL: "SYNTHESIS AND CHARACTERISATION OF POLYGLUCURONAN" CARBOHYDRATE POLYMERS, vol. 27, no. 4, 1 janvier 1995, pages 295-297, XP000539408 * page 295, colonne 1, alinéa 1; figure 1; tableau 2 *	1-4	
X	COURTOIS J ET AL: "EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY THE RHIZOBIUM MELILOTI M5N1 CS STRAIN. LOCATION AND QUANTITATION OF THE SITES OF O-ACETYLATION" CARBOHYDRATE POLYMERS, vol. 25, no. 1, 1994, pages 7-12, XP000474721 * page 7, colonne 2, alinéa 2 - page 8, colonne 1, alinéa 3; figure 1 * * page 8, colonne 2, alinéa 6 - page 9, colonne 1, alinéa 1 *	7,8	
X	EP 0 506 326 A (PROTAN BIOPOLYMER AS ;NOBIPOL NOBIPOLS FORSKNINGSTI (NO)) 30 septembre 1992 * page 5, ligne 1-5 * * page 7, ligne 15-20; figures 1,5; tableaux 1,2 *	1-4	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
X	WO 93 18174 A (UNIV PICARDIE) 16 septembre 1993 * page 19, ligne 4 - page 21, ligne 18 *	7,8,10	
1	Date d'achèvement de la recherche 15 avril 1999	Examinateur A. Jakobs	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant P : document intercalaire	
EPO FORM 1503 03.82 (P04C10)			